Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZÜCHTUNG UND BESTIMMUNG VON TYPHUS-VI-PHAGEN AUS ABWASSER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1962

vorgelegt von
Hans-Wolfgang Ackermann
aus Berlin

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZÜCHTUNG UND BESTIMMUNG VON TYPHUS-VI-PHAGEN AUS ABWASSER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Wolfgang Ackermann
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald Harndt
Referent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt
Korreferent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19. Februar 1962

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546822_0014

Inhalt

A. Einleitung

B. Material und Methodik

I. Gang der Untersuchungen

II. Bakteriophagen- und Bakterienstämme

III. Nährmedien

IV. Allgemeine Methodik

V. Spezielle Methodik

1. Isolierung von Phagen und Salmonellen
2. Aufstellung von Lysespektren
3. Messung der Lochgröße
4. Ermittlung der Temperaturempfindlichkeit
5. Serologische Untersuchungen

C. Ergebnisse

I. Phagenbestimmung

1. Polyvalente Phagen
2. Vi-Phagen
   a) Lytisches Verhalten auf S. typhi
   b) Lochgröße
   c) Temperaturempfindlichkeit
   d) Serologische Eigenschaften

II. Die Verteilung von Phagen und Salmonellen auf die einzelnen Abwasserproben

III. Typhus-Spezifität der Vi-Phagen

IV. Versuche über die Vereinfachung des Vi-Phagennachweises

V. Bedeutung der Nährböden

D. Diskussion

I. Fehlerquellen beim Arbeiten mit Typhus-Vi-Bakteriophagen

II. Ergebnisse der Untersuchungen über Vi-Phagen

1. Phagennachweis
2. Phagenbestimmung
   a) Lysespektren
   b) Lochgröße
   c) Temperaturempfindlichkeit
   d) Serologische Untersuchungen

3. Identität der Vi-Phagen
4. Wert und Technik des Vi-Phagennachweises

III. Bewertung der Untersuchungsmethoden

IV. Folgerungen

E. Zusammenfassung

Untersuchungen über die Züchtung

Bestimmung von Typhus-Vi-Bakteriophagen aus Abwasser

A. Einleitung

Nach der Entdeckung des Vi-Antigens von S. typhi durch Felix u. Pitt (17,18) fanden unabhängig voneinander Craigie u. Brandon (8,9), Scholtens (50) und Sertic u. Boulgakov (52) Bakteriophagen, die spezifisch Vi-antigenhaltige Typhusbakterien lysierten.

Craigie u. Yen (10,11,12) untersuchten eine größere Zahl dieser Phagen und unterteilten sie nach Lochgröße, Wirtsspektrum, Temperaturempfindlichkeit und serologischen Eigenschaften in 4 Typen, I, II, III und IV.

In Fortführung der Arbeiten von Craigie u. Yen isolierte Desranleau (13) und Desranleau u. Martin (14) mehrmals die bekannten Typen I-IV sowie zwei weitere Vi-Phagen, die sie als Typen V und VI bezeichneten; die Lochgröße und Temperaturempfindlichkeit des Phagen V wurden beschrieben (13). Im Jahre 1950 untersuchte Scholtens (49) das Verhalten von 13 verschiedenen, aus Abwasser isolierten Vi-Phagen auf den Typhus-Vi-Typenstämmen nach Craigie u. Yen.

Mit der Arbeit von Brandis u. Imamura (4) erschien eine eingehende und systematische Beschreibung von 4 Vi-Phagen; einer dieser Phagen wurde in der Folge als serologischer Typ VII bezeichnet. Schließlich erwähnte Scholtens (48) anpaßbare, mit den Typen II, III bzw. VII verwandte Vi-Phagen. In letzter Zeit berichtete Chomiczewski (6) über einen Vi-Phagen, der sich serologisch von den Typen II, III, IV, V und VII unterscheidet und für die Ergänzungslysotypie bei F_1- und F_4-Stämmen verwendet werden kann. Die Isolierung von Vi-Phagen aus Abwasser und anderen Materialien erwähnen Billaudelle (2), Guélin (23, 24, 25, 26), Hudemann (30), Leclerc (35) und Nicolle u. Mitarb. (40).

Aus den genannten Arbeiten geht hervor, daß in zahlreichen Fällen die Isolierung von Vi-Phagen gelungen ist; allerdings werden nur von wenigen Autoren genauere Angaben über die Eigenschaften der gefundenen Phagen gemacht. Tatsächlich scheint eine Vielzahl unterschiedlicher Phagen vorzukommen. Eine gezielte Untersuchung konnte daher mit gewisser Wahrscheinlichkeit zur Entdeckung bisher unbekannter Phagen führen. Damit war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit gesetzt. Nebenher sollten Versuche über einen einfachen Vi-Phagennachweis angestellt und die Spezifität der Typhus-Vi-Phagen geprüft werden.

B. Material und Methodik

I. Gang der Untersuchungen

Aus Abwasserproben sollten Vi-Phagen isoliert werden. Gleichzeitig wurden diese Proben auf die Anwesenheit von Salmonellen geprüft. Zur Charakterisierung der Phagen zogen wir die gleichen Kriterien wie Craigie u. Yen heran: Feststellung der Lochgröße, Prüfung der Temperaturempfindlichkeit und des Wirtsspektrums auf verschiedenen Typhusstämmen und schließlich der Nachweis bestimmter serologischer Eigenschaften. Hierbei lehnten wir uns an die Technik der Arbeit von Brandis u. Imamura an.

Da wir die Aufstellung von Lysespektren für die empfindlichste Methode der Phagendifferenzierung hielten, besonders bei Verwendung verdünnter Phagenpräparationen, stellten wir unsere Vi-spezifischen Lysate auf die CTD ("Critical Test Dilution", 12) ein. Das lytische Verhalten dieser Präparationen wurde auf den derzeit bekannten Typhus-Vi-Typenstämmen getestet. Von mehreren gleichartig reagierenden gelangte ein Lysat in die engere Untersuchung, d. h. es wurde auf seine Temperaturempfindlichkeit usw. geprüft.

Die reingezüchteten Vi-Phagen sollten dann mit den klassischen Vi-Phagen I-VII verglichen werden. Dazu mußten diese vielfach neu untersucht werden, da die Angaben anderer Autoren für einen solchen Vergleich zu wenig umfassend waren. Daran schlossen sich Versuche über die Typhus-Spezifität und die Vereinfachung des Nachweises von Vi-Phagen.

II. Bakteriophagen- und Bakterienstämme

Aus 2x6 Abwasserproben gewannen wir 50 reine Phagenpräparationen, davon 43 Vi-spezifische. Außerdem wurden die Typhus-Vi-Phagen I-VII und die Salmonella-O-Phagen 1-3 in die Untersuchungen einbezogen.

Die Prüfung auf Salmonella- bzw. Vi-Spezifität erfolgte auf S. typhi mit und ohne Vi-Antigen, S. paratyphi B und anderen Salmonellen, ferner Shigellen, E. coli, Kl. pneumoniae und Proteus OX 19 (s. Tab. 1). Zur Aufstellung der Lysespektren wurden die Vi-Phagen auf die 65 Typhus-Vi-Typenstämme A-45 gebracht. Für Versuche über die Typhus-Spezifität der Vi-Phagen standen uns ein Paratyphus C- und zwei Citrobacter-Stämme (in Tab. 8 als "Ballerup" bzw. "Citrobacter" geführt) in ihrer Vi-positiven und Vi-negativen Variante zur Verfügung, ferner die Vi-positiven sogenannten Paracoli-Stämme L_2 und L_6.

Die CTD ist hier diejenige Verdünnung, die auf dem Typhus-Typenstamm A 2624 eben noch eine konfluierende Lyse ergibt.

III. Nährmedien

Von festen Medien verwendeten wir als Standardsubstrat die Endoplatte. Zur Aufstellung von Lysespektren, d. h. hier auch zur Prüfung von Vi- und Typhus-Spezifität, benutzten wir wegen des fördernden Einflusses von Schwefel auf das Wachstum einiger Typhusstämme (31) den Standardnährboden für Lysotypie mit $Na_2S_2O_3$-Zusatz ("Liebig-Platte") sowie die Wasserblau-Dextrose-Platte nach Bresch (zitiert nach Raettig u. Hofmann, 45; "Blauplatte"). Zu besonderen Versuchen wurden die Endoplatte mit Glyzerinzusatz, die Blut- und die Elekplatte herangezogen. Als flüssiges Medium benutzten wir gewöhnliche Bouillon.

IV. Allgemeine Methodik

Die Aufstellung dieses Abschnitts erwies sich als notwendig, da einzelne Verfahren in fast allen Arbeitsgängen wiederkehren.

Unsere Versuche wurden bei einer Bebrütungszeit von 16 bis 18 Stunden und einer Bebrütungstemperatur von 37° C durchgeführt.

Die Testkeime wurden auf Dorset-Einährboden fortgezüchtet, bei + 4° C aufbewahrt und bei Bedarf auf Endoagar überimpft.

Als bakterielles Substrat zur Phagenisolierung, -fortzucht und -titration, zur Ermittlung der Lochgröße und Temperaturempfindlichkeit sowie bei Kreuzneutralisationstesten verwendeten wir den Typenstamm A 2624 von S. typhi, und zwar als 18-stündige Bouillonkultur.

Zur Fortzucht von Phagen gaben wir mit der Pipette in ein Zentrifugenglas mit 5 ml Bouillon einen Tropfen einer Bouillonkultur des Typenstammes A sowie eine Öse Phagensuspension. Nach Bebrütung wurde 20 Minuten lang mit 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand 50 bis 60 Minuten im Wasserbad auf 56° C erhitzt. Die Lysate wurden in Röhrchen mit paraffinierten Stopfen bei + 4° C aufbewahrt. Eine Abnahme des Phagengehalts konnte dabei nicht festgestellt werden.

Die Lysereaktionen wurden von festen Nährböden abgelesen. Hierzu wurden die gut getrockneten Platten mit den Keimsuspensionen in der Weise beimpft, daß entsprechend der Technik von Craigie u. Yen (12) pfenniggroße Keimaussaaten entstanden, oder es wurde die gesamte Platte mit 0, 2 ml Keimsuspension ausgespatelt, wobei die Platte gedreht wurde. Die Phagen wurden auf markierte Stellen mit der Öse aufgebracht. Sollten einzelnstehende Phagenlöcher erhalten werden, so wurden mit der Pipette jeweils 0, 2 ml Phagensuspension geeigneter Verdünnung auf dem Wirtsstamm ausgespatelt, ebenfalls unter Drehen der Platte.

Für die Überlassung von Phagenpräparationen und Bakterienkulturen darf ich Herrn Dr. J. -M. Desranleau (Montreal), Herrn Dr. S. Hofmann (Berlin), Herrn Prof. Dr. F. Kauffmann (Kopenhagen), Herrn Dr. P. Nicolle (Paris), Herrn Dozent Dr. H. Rische (Wernigerode) und Herrn Prof. Dr. H. Seeliger (Bonn) verbindlichst danken.

Die Titration der Lysate erfolgte in Zehnerpotenzen. Bei Bedarf wurden Zwischenverdünnungen hergestellt.

V. Spezielle Methodik

1. Isolierung von Phagen und Salmonellen

Ausgangsmaterial waren 2x6 Abwasserproben, die im Januar bzw. April 1959 im Pumpwerk Charlottenburg I und an verschiedenen Stellen des Rieselfelds Karolinenhöhe in Berlin-Gatow entnommen wurden.

Je nach Trübungsgrad und dem zu erwartenden Salmonellengehalt wurden im Unterdruckverfahren 2x50 oder 2x100 ml Abwasser durch je einen Membranfilter "Coli 5" der Membranfiltergesellschaft Göttingen filtriert.

Zur Isolierung von Phagen wurden in Anlehnung an das Verfahren von Nyberg (42) 10 ml Filtrat mit 10 ml Bouillon versetzt und mit 0,2 ml einer 2-stündigen Bouillonkultur des Typenstammes A beimpft. Nach erfolgter Anreichung und 50 bis 60 Minuten dauerndem Erhitzen auf 56° C wurde in einem Vorversuch diejenige Verdünnung ermittelt, die gerade einzelnstehende Phagenlöcher ergab. Hiervon wurden 0,2ml auf Liebig-Agar ausgespatelt und alle unterschiedlich großen Phagenlöcher mit der Nadel abgeimpft. Zur Reinzucht gingen wir von Einzellöchern aus und führten die abgeimpften Phagen in wenigstens 3 Passagen über den Typenstamm A fort.

Zur Isolierung von Salmonellen standen je Probe zwei Filter zur Verfügung; durch jedes waren 50 oder 100 ml Abwasser filtriert worden. Je ein Filter wurde in K-Tetrathionat-Kristallviolett-Brühe nach Preuß bzw. Na-Selenit-Nährbrühe nach Leifson eingelegt. Nach 20-stündiger Bebrütung erfolgte die Ausimpfung der Anreicherungen auf je 2 Agarplatten nach Wilson u. Blair. Die serologische Untersuchung der Salmonella-verdächtigen Kolonien nahm Herr Dr. Lenk aus unserem Institut vor.

2. Aufstellung der Lysespektren

0,7 ml Bouillon wurden mit dem betreffenden Testkeim beimpft und 2 Stunden bebrütet. Weiteres s. oben.

3. Messung der Lochgröße

Die Phagenlöcher wurden mit dem Stechzirkel abgemessen oder abgeschätzt, wenn dieses unmöglich war.

4. Ermittlung der Temperaturempfindlichkeit

Die zu untersuchenden Phagenpräparationen wurden auf die CTD eingestellt und 60 Minuten lang im Wasserbad erhitzt,

a) zur Feststellung des TDP ("Thermal Death-point", 10,12), d.h. derjenigen Temperatur, bei der alle Phagen der Präparation inaktiviert waren, bei jeweils verschiedenen Temperaturen, oder

b) nach dem Verfahren von Giuntini u. Mitarb. (21) bei 60° C. Dabei wurden nach 0,2,4,6,8,10,12,15,20,25,30,40,50 und 60 Minuten je 0,1 ml Phagenpräparation mit der Kapillarpipette aufgenommen, im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und davon je 3 x 0, 2 ml auf Platten ausgespatelt. Die Auszählung der Phagenkolonien erfolgte mit dem Zählapparat nach Apoth. Huss/Kiel, bzw. die der Phagen I, IV und 3 unter dem Plattenmikroskop.

5. Serologische Untersuchungen

Da nur eine beschränkte Anzahl von Versuchstieren zur Verfügung stand, wurden willkürlich 6 selbst isolierte Vi-Phagen (1a, 1b, 2a, 2c, 4 und 5) ausgewählt und mit diesen und mit den klassischen Vi-Phagen I-VII Kaninchen immunisiert. Um Tierverluste zu vermeiden, behandelten wir entsprechend dem Vorgehen bei der Herstellung von Typhus-Antiseren (58) die Tiere mit kleinen, steigenden Mengen der konzentrierten Lysate (0. 5, 1. 0, 1. 5, 2. 0, 2. 5 ml alle 5 Tage i. v. injiziert). Nach 20 Tagen Wartezeit wurden die Tiere entblutet. Die Antiphagenseren wurden in geometrischer Reihe zweifach bis 1 : 5120 verdünnt und nach dem Verfahren von Anderson u. Felix (1) mit den Serumverdünnungen gekreuzte Neutralisationsteste vorgenommen. Hierzu wurden 0, 5 ml der Serumverdünnungen mit 0, 5 ml CTD des zu prüfenden Phagen versetzt, über Nacht im Kühlschrank gehalten und dann ausgeimpft. Die Neutralisation war vollständig, wenn nach Bebrütung auf der Testplatte keine Anzeichen einer Lyse zu erkennen waren.

Über Versuche zum Nachweis von präzipitierenden Antikörpern s. "Ergebnisse".

C. Ergebnisse

Die Ergebnisse werden in chronologischer Folge geschildert. Lediglich die Salmonellenbefunde sollen zusammen mit der Herkunft der Phagen besprochen werden. Es erwies sich als notwendig, die Beobachtungen über die Bedeutung der Nährböden in einem besonderen Abschnitt zusammenfassen.

I. Phagenbestimmung

Aus 12 Abwasserproben wurden 50 Phagenpräparationen gewonnen, die nach mehrfacher, von einzelnstehenden Phagenlöchern ausgehender Fortzüchtung als gereinigt angesehen werden konnten. Die unverdünnten Lysate wurden auf der gleichen Auswahl von Enterobakteriazeen, wie sie Tabelle 1 zeigt, getestet. Dabei ergab sich, daß 43 von 50 Lysaten Vi-Phagen enthielten, die restlichen die polyvalenten Phagen P_4 und P_5. Als Nebenergebnisse wurden die Lysespektren dieser Phagen gefunden.

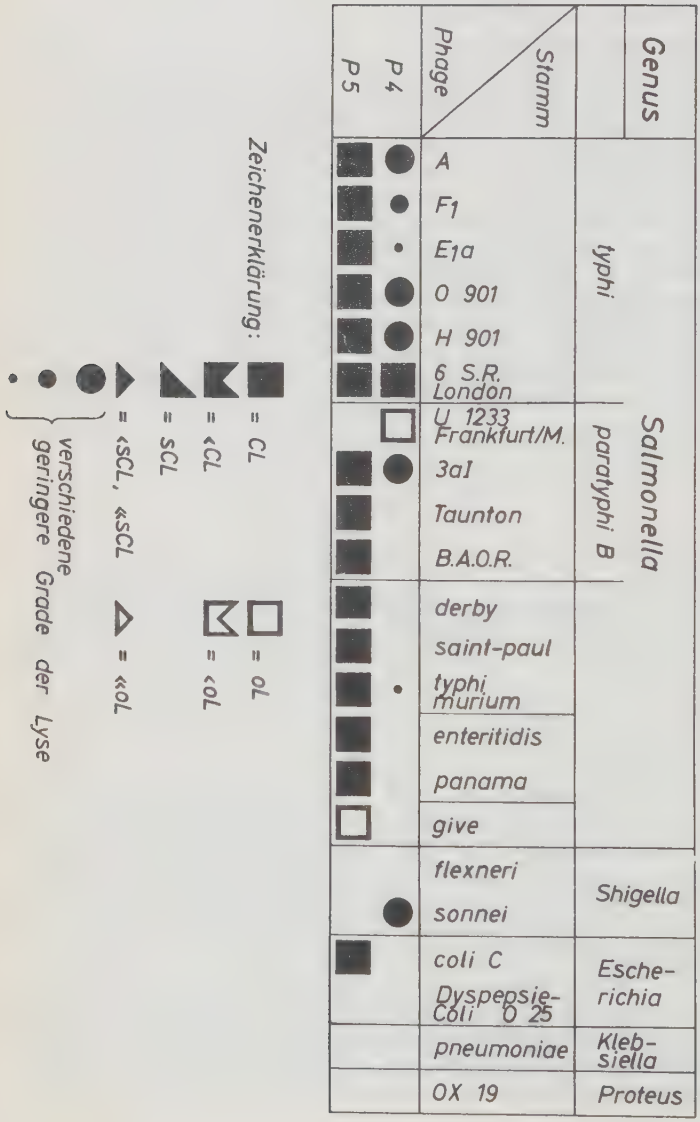
Die Phagen P_4 und P_5 sollen zunächst beschrieben werden. Da ihre Charakterisierung nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit war, stellten wir nur ihre Lochgröße und CTD fest, die der Kürze halber hier aufgeführt werden.

1. Polyvalente Phagen

Die Lysespektren der Phagen P_4 und P_5 zeigt Tabelle 1.

Tab. 1

Lysespektren der polyvalenten Phagen P4 und P5



Man sieht, daß diese Phagen eine sehr verschiedene lytische Aktivität besitzen. Obwohl sie beide Keime der Typhus-Paratyphus-Enteritis-Gruppe lösen, ist das Wirtsspektrum des Phagen P_4 klein und umfaßt beinahe nur S. typhi, während Phage P_5 den größten Teil der Teststämme lysiert. Die beiden Stämme der Gattungen Klebsiella und Proteus wurden nicht gelöst. Angesichts der geringen Zahl der Teststämme läßt sich natürlich nichts Endgültiges über beide Lysespektren aussagen.

Phage P_4, der bei der Untersuchung von Rohlysaten auf dem Paratyphus-Rauhstamm Frankfurt/M. gefunden wurde, bildet auf dem Typenstamm A von S. typhi kleine, auf dem Rauhstamm Frankfurt/M. große Löcher. Dagegen verhält sich Phage P_5 auf allen Testkeimen als Kleinlochphage.

Die CTD des Phagen P_4 lag nie über einer Verdünnung von 10^{-1}, selbst wenn dieser Phage auf dem Rauhstamm Frankfurt/M. fortgezüchtet wurde. Die CTD des Phagen P_5 lag bei 10^{-2}.

2. Vi-Phagen

a) Lytisches Verhalten auf S. typhi

Die 43 Vi-spezifischen Phagenpräparationen wurden bis zur CTD verdünnt und das Verhalten der verdünnten Präparationen auf den 65 Typhus-Vi-Typenstämmen A-45 getestet. Dabei ergaben sich 14 Verhaltensweisen. Entsprechend wurden 14 Lysate zur näheren Untersuchung ausgewählt und als Vi-Phagen 1a bis 6 bezeichnet.

Anschließend wurden die unverdünnten Präparationen der Phagen 1a-6 sowie der klassischen Vi-Phagen I-VII auf den gleichen Typhus-Typenstämmen versucht.

Tabelle 2a zeigt die Lysespektren der verdünnten Phagen 1a-6, die Tabellen 2b und 2c die der unverdünnten Phagen 1a-6 bzw. I-VII. Die Legende ist die gleiche wie für Tabelle 1.

Tab. 2

Lysespektren der Vi-Phagen 1a-6 und I-VIII

Aus den Tabellen 2b und c geht zunächst hervor, daß die klassischen Vi-Phagen mit den Phagen 1a-6 nicht identisch sind. Sie zeigen auch kein einheitliches lytisches Verhalten. Beide Tabellen müssen also gesondert betrachtet werden.

Obwohl die Lysespektren der Phagen 1a-6 teilweise sehr ähnlich sind, können sie in 2 Gruppen unterteilt werden. Die erste umfaßt die Phagen 1a-3, die zweite die Phagen 4-6. Der wichtigste Unterschied zwischen beiden Gruppen ist, daß die Phagen 4-6 die Typenstämme C_1-C_7 lysieren, die Phagen 1a-3 nicht. Innerhalb der Gruppe 1a-3 unterscheiden sich die Phagen 2a-3 von den Phagen 1a-e durch ihre stärkere Affinität zu den Typenstämmen D_6, E_9, F_2 und 29, wobei diese Unterschiede am deutlichsten in Tabelle 2a hervortreten.

Tab. 2c zeigt, daß die Phagen I und IV, III und V bzw. VI und VII sich bemerkenswert ähnlich verhalten. Einzig der an den Typenstamm A angepaßte Phage II, also der Phage A, besitzt ein charakteristisches Lysespektrum; er lysiert die wenigsten Typenstämme. Dies stimmt mit den Angaben im Schrifttum überein (5).

Weiter fällt die Ähnlichkeit der Lysespektren der Phagen 5-6 und III u. V auf, welche kaum zu unterscheiden sind. Allerdings lysieren die Phagen 5 und 6 den Typenstamm 28 deutlich und den Typenstamm 32 nur schwach. Geringer ist die Ähnlichkeit zwischen dem lytischen Verhalten der Phagen 1a-4 und III u. V.

Die Sensibilität der einzelnen Typenstämme gegen die getesteten Phagen ist sehr verschieden. Typenstamm 32 wird von keinem Phagen gelöst, andere, wie C_7, C_8, E_2, E_7, F_3, H, M_2, 26, 27, 31, nur schwach oder selten. Die Typenstämme A, F_1, K, 30 und 43 zeigen nicht nur eine konfluierende, sondern auch eine vollständige Lyse (Typenstamm F_1 jedoch nicht mit dem Phagen VII). Die Phagen I und IV lysieren fast alle Typenstämme; aus diesem Grunde werden sie auch als Kontrollphagen für die Lysotypie von S. typhi verwandt.

b) Lochgröße

Für die Beurteilung der Lochgröße ist der Gesamteindruck der Platte entscheidend, da der gleiche Phage auf einer Platte Kolonien verschiedener Größe bilden kann. Besonders Phage VII bildet ohne ersichtliche Ursache dicht nebeneinander stehende Phagenlöcher aller Größen. Auf Grund der unterschiedlichen Lochgrößen konnten nun mehrere Phagengruppen aufgestellt werden.

Tab. 3

Einteilung der Vi-Phagen 1a-6 und I-VII nach ihrer Lochgröße

Phagen	Häufigste Lochgröße in mm	Gruppe
1a, 1e, 2a 2b, 2c, 2d 2e, 4, 5 III, V, VI	2-3	A
1c, 1d, 6	1-›1.5	B
1b, II, VII	‹0.5-1	C
I, IV, 3	‹0.5	D

Die meisten der untersuchten Phagen sind Großlochphagen (Gruppe A), d. h. die ausgebildeten Phagenlöcher haben einen Durchmesser von 2-3 mm. Bei den in Gruppe D zusammengefaßten Phagen I, IV und 3 handelt es sich um Kleinlochphagen. Interessanterweise bildet Phage 3 neben massenhaft kleinen wenige große Kolonien von 2-3 mm Durchmesser. Dieses Verhalten wurde bei mehr als 10 Passagen über den Typenstamm A beobachtet.

Die Lochgröße bestimmt wesentlich die CTD (12); da diese eine Grenzkonzentration darstellt, ist sie abhängig von der Größe der Phagenlöcher, die eine lysierte Fläche bilden. Entsprechend liegt die CTD der in Gruppe A zusammengefaßten Großlochphagen ziemlich einheitlich in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-5}, nur die des Vi-Phagen V bei 10^{-2}. Bei Kleinlochphagen liegt die CTD auf der Endoplatte bei 10^{-2}, auf der Blauplatte bei 10^{-4}.

Hier ist noch das Phänomen der Hofbildung zu besprechen. Die Bildung eines Hofs, der vielleicht mit dem "anneau blanc hypertrophique" von Sertic u. Boulgakov (53) identisch ist und eine Zone halblysierten Bakterienrasens oder auch einen Ring von stehengebliebenen Bakterienkolonien an der Peripherie des Phagentropfens darstellt, wird in ihrem Ausmaß von der spezifischen Lochgröße des betreffenden Phagen bestimmt. Großlochphagen bilden einen großen, Kleinlochphagen einen kleinen Hof. An isolierten Phagenkolonien konnte eine Hofbildung jedoch nie festgestellt werden, immer aber, wenn die Phagen unverdünnt oder in der CTD ausgeimpft wurden.

c) Temperaturempfindlichkeit

Die Temperaturempfindlichkeit der Vi-Phagen wurde auf zwei Wegen ermittelt, durch Feststellung der zur Inaktivierung einer Phagensuspension gerade ausreichenden Temperatur (TDP) und durch Beobachten des Fortschreitens der Phageninaktivierung bei gleichbleibender Temperatur.

Nach ihrem TDP konnten die untersuchten 21 Phagen in 7 Gruppen eingeteilt werden :

Tab. 4 u. 5

Einteilung der Vi-Phagen 1a-6 und I-VII nach ihrer Temperaturempfindlichkeit

1.) TDP

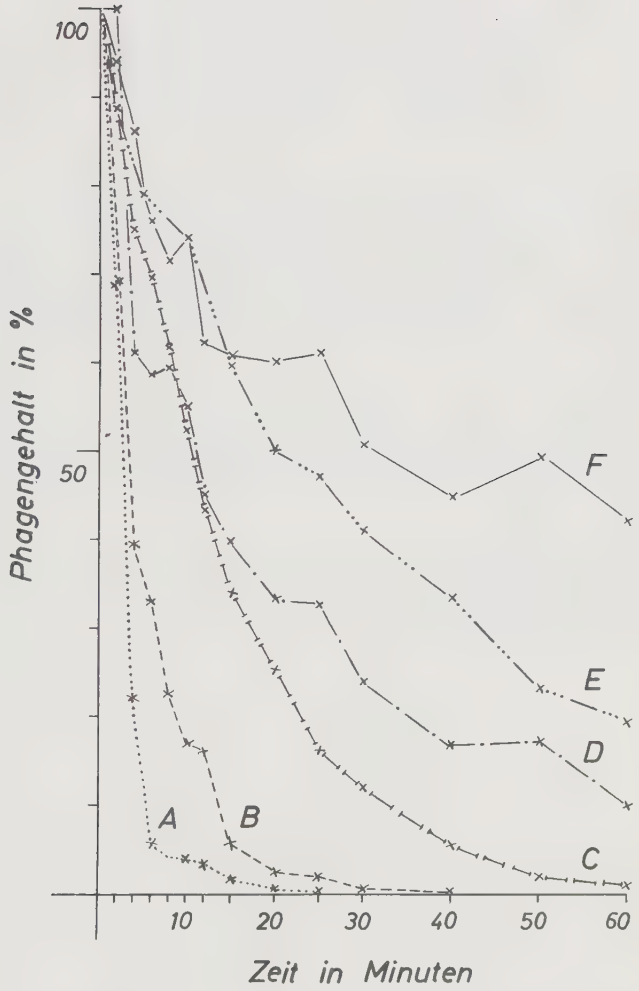
	Temperatur in °C						
	58°	59°	60°	61°	62°	66°	68°
Phagen	VII×	1b, 1d 1e, 2b 2c	2a, 2e 4, III V, VI	1a 5 6	1c 2d 3	I IV	II

2.) Gruppierung nach Gleichheit der Kurven (ohne Phage II)

Gruppe	A	B	C	D	E	F
Phagen	1d	1b, 1e 2b, 2c 4, VII×	1a, 2a, 2e 6, III, V VI	3	1c 2d 5	I IV

× = n. Brandis u. Imamura

Abb. 1



Verhalten der Vi-Phagen 1a-6, I und III-VII bei Erhitzen auf 60° C

Hiernach ist der hitzeempfindlichste Phage der Vi-Phage VII. Der TDP der meisten Phagen liegt bei 59 und 60° C. Phage II zeigt die größte Thermoresistenz, d. h. er wird erst bei 68° C inaktiviert.

Das zweite Verfahren hatte den Vorteil, daß durch Auszählung von Phagenkolonien das Ausmaß der Phageninaktivierung als Funktion der Zeit in Kurven ausgedrückt werden konnte. Die erhaltenen Kurven wurden übereinander projiziert, wobei mehrere sich deckten. Insgesamt fanden wir 6 Verhaltensweisen und unterteilten entsprechend die Phagen 1a-6, I und III-VII in die Gruppen A bis F. Die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 5 aufgeführt, die dazugehörigen Kurven in Abbildung 1.

Hiernach zeigt Phage 1d die größte Hitzeempfindlichkeit, die Phagen I und IV die geringste. Es gelang uns nicht, eine Kurve über das Verhalten des Phagen II aufzustellen, da sich dieser, wie oben gesagt, als ausgesprochen thermoresistent erwies. Auch bei mehrmaliger Wiederholung der Versuche wurden bei der einmal gewählten Temperatur von 60° C keine Anzeichen einer Phageninaktivierung beobachtet. Allerdings lassen sich bei Heraufsetzung der Versuchstemperatur für den Phagen II ähnliche Kurven wie in Abbildung 1 erwarten.

Der Vergleich der Tabellen 4 und 5 zeigt, daß beide Verfahren zur Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit die Phagen zwar ähnlich, aber nicht exakt gleich unterteilen. Dieses liegt an der Verschiedenheit der Methodik und soll später ausführlich besprochen werden.

d) Serologische Eigenschaften

Die Ergebnisse der Kreuzneutralisationsteste mit Phagensuspensionen gleichbleibenden Phagengehalts und Antiphagenseren steigender Verdünnung zeigt Tabelle 6.

Serologische Beziehungen der Phagen 1a, 1b, 2a, 2c, 4 und 5 zu den Phagen I-VII

Phage \ Serum	1a	1b	2a	2c	4	5	I	II	III	IV	V	VI	VII
1a	320	80	40	40	20	×	—	—	×	—	—	—	—
1b	160	320	80	160	40	20	×	—	20	—	—	—	—
2a	×	20	640	320	160	40	×	—	40	—	—	—	—
2c	×	×	80	640	40	×	—	—	×	—	—	—	—
4	×	×	640	160	320	40	×	—	×	—	—	—	—
5	×	×	40	80	40	320	—	—	40	—	—	—	—
I	—	—	—	—	—	—	2560	—	—	20	—	—	—
II	—	—	—	—	—	—	—	320	—	—	—	—	—
III	×	×	160	×	×	×	—	—	160	—	—	—	—
IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	320	—	—	—
V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	640	×	×
VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1280	×
VII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	40	640

Die Zahlen geben die Serumverdünnungen an, welche die Phagenwirkung gerade noch vollständig hemmen (1/40, 1/80 usw.)

× = Hemmung unvollständig bereits bei 1/20

— = keine Hemmung

Hiernach sind die Phagen 1a, 1b, 2a, 2c, 4 und 5 serologisch mehr oder weniger verwandt. Alle diese Phagen zeigen Antigenbeziehungen zum Phagen III, am deutlichsten der Phage 2a. Weiter besteht eine Antigenverwandtschaft zwischen den Phagen 1b, 2a, 4 und I. Daß das Antiphagenserum I die Phagen 1b, 2a und 4 neutralisiert, nicht dagegen Phage I durch die entsprechenden Seren inaktiviert wird, ist dadurch bedingt, daß Phage I als Kleinlochphage schwierig zu beobachten ist.

Weiter stellten wir fest, daß die von uns isolierten Phagen sich gegenüber den klassischen Vi-Phagen relativ selbständig verhalten. Die vorhandenen Antigenbeziehungen sind teilweise gering. Die größte Selbständigkeit zeigt Phage 1a.

Zu bemerken ist noch, daß nach unserer Tabelle Serum IV den Phagen I neutralisiert, wenn auch nur schwach. Dieses wurde weder von Craigie u. Yen (12) noch von Brandis u. Imamura beobachtet. Hier dürfte ein methodischer Fehler als Ursache angesprochen werden.

Darüber hinaus wurde versucht, außer neutralisierenden auch präzipitierende Antikörper im Agar-Diffusionsverfahren nach Herrlich u. Mitarb. (29) nachzuweisen. Präzipitierende Antikörper gegen Bakteriophagen werden in neueren Arbeiten von Weidel u. Koch (57) und Lanni u. Lanni (34) erwähnt. Die Versuche wurden unter Verwendung von 1,5%igem Agar durchgeführt und zeigten während einer Versuchsdauer von einer Woche kein Ergebnis. Der negative Ausfall dieser Versuche spricht nicht gegen das Vorhandensein solcher Antikörper; diese lagen vielleicht in zu geringer Konzentration vor, um sichtbare Reaktionen zu geben.

II. Die Verteilung von Phagen und Salmonellen auf die einzelnen Abwasserproben

ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Die im Januar entnommenen Proben bezeichnen wir als Serie A, die im April entnommenen als Serie B. Tabelle 7a zeigt die Verteilung der Phagen auf beide Probenserien, die Tabellen 7b und c zeigen die relative Häufigkeit der Phagen sowie die Salmonellenbefunde.

Tab. 7

Verteilung der Phagen auf die im Januar (A) und April (B) 1959 gewonnenen Abwasserproben

Phage / Serie	1a	1b	1c	1d	1e	2a	2b	2c	2d	2e	3	4	5	6	P4	P5	Zahl d. Abimpfungen
A			×	×	×		×	×	×							×	19
B	×	×				×				×	×	×	×	×	×		31

In Serie A gefundene Phagen und Salmonellen

Probe	Phagen 1c	1d	1e	2b	2c	2d	P5	Salmonellen
I		1					1	S. java, 2x S. paratyphi B " panama, S. typhi (D_2) " aberdeen
II	2					1	1	S. java, S. paratyphi B " braenderup " aberdeen
III				1	2		1	3x S. paratyphi B S. typhi (F_1) " aberdeen
IV			3				1	keine Salmonellen nachgewiesen
V			2				1	
VI		1					1	
Summe	2	2	5	1	2	1	6	

In Serie B gefundene Phagen und Salmonellen

Probe	Phagen 1a	1b	2a	2e	3	4	5	6	P4	Salmonellen
I	4		1						1	S. java " montevideo
II			4			1				S. java, S. paratyphi B " montevideo " give, S. aberdeen
III		1	4							S. java, S. montevideo " enteritidis " give, S. aberdeen
IV							1	4		2x S. paratyphi B S. panama, S. enteritidis " give
V			4		1					S. paratyphi B " montevideo, S. blockley " enteritidis, S-Rauhstamm
VI			3	2						S. enteritidis " give
Summe	4	1	16	2	1	1	1	4	1	

Vi-Phagen waren in allen Proben enthalten. Der polyvalente Phage P_5 wurde aus sämtlichen Proben der Serie A isoliert, Phage P_4 nur aus Probe B I, noch dazu außerhalb des eigentlichen Trennungsgangs (s. oben). Am häufigsten fand sich der Vi-Phage 2a, der 16mal isoliert wurde. Besonders interessant ist, daß keiner der im Januar isolierten Phagen im April wiedergefunden wurde. Auch innerhalb der einzelnen Probenserien war die Verteilung der Phagen eine sehr unterschiedliche; so wurden die Phagen 5 und 6 nur in Probe B IV und in dieser auch keine anderen Phagen gefunden.

Salmonellen isolierten wir aus 3 Proben der Serie A und aus allen Proben der Serie B. Am häufigsten waren Stämme verschiedener Lysotypen von S. paratyphi B, S. java und S. aberdeen. S. typhi wurde nur zweimal gefunden.

Daß aus den im Januar 1959 entnommenen Proben IV, V und VI keine Salmonellen isoliert wurden, erklärt sich wahrscheinlich durch die lange Aufbewahrung der Proben vor ihrer Aufbereitung. Anfangs verwandten wir zur Salmonellenanreicherung nur K-Tetrathionat-Kristallviolett-Brühe nach Preuß, die zudem nicht der Vorschrift entsprechend zubereitet worden war. Bis zur Entdeckung dieses Fehlers hatten die Proben bereits zwei Monate gelagert.

III. Typhus-Spezifität der Vi-Phagen

Einer Anregung von Dr. Nicolle (Institut Pasteur, Paris) folgend, interessierten wir uns für das Verhalten von Vi-Phagen gegenüber Vi-haltigen Nicht-Typhusstämmen. Zur Prüfung kamen die in Tabelle 8 aufgeführten Phagen und Bakterienstämme, mit denen wir die nachstehenden Reaktionen erhielten; Legende s. Tabelle 1.

S. paratyphi C mit Vi-Antigen wurde nur von den Vi-Phagen I und IV, den Salmonella-O-Phagen 1-3 und dem Phagen P_5 angegriffen. Der sogenannte "S. ballerup"-Stamm wurde von unseren Phagen 5 und 6 sowie den klassischen Vi-Phagen I, III und IV, "Citrobacter" dagegen von Vi-Phagen überhaupt nicht lysiert. Die beiden Paracoli-Stämme L_2 und L_6 wurden von der Mehrzahl der getesteten Phagen gelöst. Jedenfalls geht aus Tabelle 8 hervor, daß Vi-Phagen möglicherweise auch von anderen Bakterien als S. typhi stammen können.

Interessant war, daß die Vi-positiven Varianten von "S. ballerup" und "Citrobacter" von den polyvalenten Phagen P_5 bzw. P_4 gelöst wurden, die Vi-negativen jedoch nicht.

Verhalten von Vi- und O-Phagen auf Vi-positiven Nicht-Typhusstämmen

Stamm \ Phage	Vi-Phagen 1a	1b	1c	1d	1e	2a	2b	2c	2d	2e	3	4	5	6	I	II	III	IV	V	VI	VII	O-Phagen 1	2	3	P_4	P_5
Parat. C Vi															□			□				■	■	■		■
Parat. C Ø																						■	■	■		■
Ballerup Vi													□	□	□		□	□								•
Ballerup Ø																										
Citrobacter Vi																									■	
Citrobacter Ø																										
Paracoli L_2 Vi	●	◥	□	●	●	■	●	■	■	■		■	■	■	■		■	■	■							
Paracoli L_6 Vi	•	◥	■			■	□	■	■	■	□	■	■	■	■		■	■	■							

Vi = Vi-positiv
Ø = Vi-negativ

IV. Versuche über die Vereinfachung des Vi-Phagennachweises

Bis jetzt besteht die einzig sichere Methode des Nachweises von Vi-Phagen darin, daß die betreffenden Lysate durch mehrmaliges Abimpfen von einzelnstehenden Phagenlöchern reingezüchtet und auf ihre Vi-Spezifität geprüft werden. Erst dann kann gesagt werden, ob es sich um Vi-Phagen handelt. Dieser Prozeß erfordert einen großen Aufwand und mindestens 12 Arbeitstage. Eine Abkürzung dieses Verfahrens erschien wünschenswert.

Die einfachste Methode des Nachweises von Vi-Phagen ist die Benutzung eines Bakterienstammes, der ausschließlich Vi-Phagen anreichert. Besonders Guélin (23, 24, 25, 26) versuchte diesen Weg zu gehen, allerdings ohne Erfolg; der von ihr als weitgehend spezifisch bezeichnete Typhus-Vi-Stamm 4 wurde auch von Paratyphus B-Phagen lysiert (23).

Eine andere Möglichkeit ist gegeben, wenn Vi- und O-Phagen sich in Art und Ausmaß der Lyse unterscheiden, hinsichtlich der Lochgröße, des Verhaltens auf verschiedenen Nährböden oder bei verschiedenen Bebrütungstemperaturen.

Bezüglich der Lochgröße verweisen wir auf unsere oben aufgeführten Befunde, wonach auf dem Typenstamm A 2624 die Mehrzahl der Vi-Phagen Großloch-, die polyvalenten Phagen P_4 und P_5 Kleinlochphagen sind. Wir fanden weiter, daß sich die O-Phagen 1-3 auf dem Typenstamm A ebenfalls als Kleinlochphagen verhielten. Da uns jedoch fast nur Vi-Phagen zur Verfügung standen, hatten wir keine genügende Vergleichsmöglichkeit.

Die Beobachtung der Lyse auf verschiedenen Nährböden, Liebig-, Blau-, Endo- und Elekplatte, ergab wie erwartet, daß Vi- und O-Phagen usw. sich auf diese Art nicht unterscheiden ließen.

Dagegen hielten wir eine solche Differenzierung auf der Blutplatte für möglich. Friedberger u. Vallen (20) und Sonnenschein (54, 55) teilten mit, daß Typhusbakteriophagen Typhuskeime in eine hämolysierende Form umwandelten. Dabei erwähnte Sonnenschein (54) außer einem "spezifischen" auch polyvalente Phagen. Wir fanden, daß auch Vi-Phagen auf dem Typenstamm A eine Hämolyse bewirkten, und zwar im Bereich des Hofes und stehengebliebener Bakterienkolonien. Das Ausmaß der hämolytischen Zone entsprach der Hofbildung.

Eine andere Möglichkeit der Unterscheidung von Vi- und O-Phagen wird dadurch gewiesen, daß Typhusbakterien Vi-Antigen nur im Bereich von 37° C bilden (16). Nicolle u. Mitarb. (39) stellten fest, daß bei 18 bzw. 41, 5° C die Lyse von S. typhi durch Vi-Phagen unterblieb, nicht dagegen die durch O-Phagen. Diese Ergebnisse wurden bestätigt, mit der Einschränkung, daß bei beiden Versuchstemperaturen auf der empfindlichen Blauplatte doch eine sehr schwache Lyse zu beobachten war.

V. Bedeutung der Nährböden

Neben der Liebig-Platte erwies sich die Blauplatte in allen Abschnitten der Untersuchung als unentbehrlich. Sie zeigte in vielen Fällen noch schwache Phagenreaktionen oder kleinste Phagenlöcher an, während mit der Liebig-Platte solche Reaktionen oft nicht erfaßt wurden.

Allerdings ist das Ausmaß der Lyse auf Liebig- und Blauplatte nicht immer gleich. Eine opake Lyse auf der Liebig-Platte kann auf der Blauplatte als vollständige Lyse erscheinen, selten umgekehrt. Diesem Umstand versuchten wir bei der Aufstellung der Lysespektren Rechnung zu tragen, indem wir auf der Blauplatte beobachtete Reaktionen nur werteten, wenn die Liebig-Platte nicht mehr anzeigte.

Auf der Blauplatte wurden einzelnstehende Phagenlöcher kleiner ausgebildet als auf der Liebig-Platte; von der Blauplatte scheint somit eine Hemmwirkung auszugehen. Diese ist durch die bei der Lyse auftretende pH-Verschiebung bedingt (36, 37, 45). Eine solche Verkleinerung der Phagenlöcher sahen wir jedoch nicht bei den Phagen I, IV und 3. Einzelne Löcher dieser Phagen waren meist nur auf der Blauplatte erkennbar, und die Auszählung von Kolonien dieser Phagen wäre ohne die Blauplatte überhaupt unmöglich gewesen.

Die Endoplatte ist ein sehr brauchbarer Nährboden für das Arbeiten mit Großlochphagen, allerdings auch hier nicht zur Aufstellung von Lysespektren geeignet. Sie kann zu Untersuchungen über Lochgröße, Temperaturempfindlichkeit und serologische Eigenschaften von Phagen herangezogen werden; Vorbedingung ist ein bakterielles Substrat, das wie die Typenstämme A, F_1, K, 30 und 43 vollständig lysiert wird.

Der Versuch, durch Zusatz von Glyzerin eine bessere Darstellung der Kolonien von Kleinlochphagen zu erreichen, mißlang. Die Angabe von Desranleau (13), wonach auf glyzerinhaltigem Agar die Phagenlöcher besser ausgebildet werden, konnten wir bei unseren Kleinlochphagen nicht bestätigen. Immerhin leistete uns dieser Nährboden gute Dienste bei der Beobachtung der unterschiedlichen Lochgrößen des Phagen 3. Erwähnenswert ist noch eine Beobachtung über die Lyse auf Endoagar mit Glyzerinzusatz; wir sahen, daß die während der Bebrütung auftretende Rötung des Nährbodens in der Randzone der Lyse am stärksten war.

Die Elekplatte eignet sich zur Anfertigung von Photos von Phagenkolonien, da Typhusbakterien auf ihr eine optisch dichte Schicht bilden. Andere Vorzüge dieser Platte wurden nicht festgestellt.

D. Diskussion

Da das Hauptziel der vorliegenden Arbeit die Beschreibung von Vi-Phagen ist, sollen zunächst mögliche Fehlerquellen besprochen werden. Darauf folgt eine Kritik der Ergebnisse mit besonderer Berücksichtigung von Wert und Technik des Vi-Phagennachweises. Weiter wird eine Bewertung der Untersuchungsmethoden versucht. Abschließend werden die Folgerungen zusammengestellt, die sich aus unserer Arbeit ergeben.

I. Fehlerquellen beim Arbeiten mit Typhus-Vi-Bakteriophagen

Zunächst sind milieubedingte Fehlerquellen zu nennen, und zwar falsche Wahl des Nährbodens, der Bebrütungszeit und -temperatur.

Über Nährböden s. oben; hier ist noch zu bemerken, daß Phagenlöcher und damit eine lysierte Fläche desto größer ausfallen, je höher der Wassergehalt bzw. je geringer die Agarkonzentration eines Nährbodens ist (22, 28). Der Einfluß von Elektrolyten auf die Lyse soll nicht besprochen werden, da dieses den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschreiten würde und wir hierüber keine Versuche anstellten.

Eine Bebrütungszeit von 16 bis 18 Stunden läßt sich bequem einhalten und ergibt gut ablesbare Ergebnisse. Nach 7 Stunden Bebrütung sind Lyse und Bakterienwachstum noch so schwach, daß einzelnstehende Phagenlöcher nicht sicher ausgezählt werden können, nach 25 Stunden kann die lysierte Zone von Sekundärkulturen überwachsen sein. Eine Versuchstemperatur von 37° C ist für Typhus-Vi-Phagen die geeignetste, da Typhuskeime Vi-Antigen nur in einem bestimmten Temperaturbereich bilden (s. oben).

In zweiter Linie ergeben sich Fehlerquellen aus Art und unrichtiger Behandlung des bakteriellen Substrats.

Daß ein Bakterienstamm, der als Standardsubstrat und nicht nur zur Aufstellung von Lysespektren verwendet wird, vollkommen lysosensibel sein muß, ist selbstverständlich; wir halten beim Arbeiten mit Typhus-Vi-Phagen den Typenstamm A für gut geeignet. Bei Überalterung einer Bakteriensuspension erhalten wir in flüssigem Milieu niedrige Phagentiter, und auf festen Medien sind die Phagenreaktionen nicht oder nur schlecht ablesbar; die Phagenlöcher fallen um so kleiner aus, je älter das bakterielle Substrat ist. Ähnlich sind die Verhältnisse, wenn die auf eine Platte gebrachte Keimschicht zu dick ist; werden zu wenig Keime ausgeimpft, so entsteht überhaupt kein Bakterienrasen. Eine gleichmäßige Verteilung der Keimsuspension ist besonders zur Bestimmung der Lochgröße wichtig.

Andere Fehlerquellen sind in unrichtiger Behandlung der Bakteriophagen zu suchen.

Besonders wichtig ist die genaue Einstellung der CTD, die eine Grenzverdünnung darstellt. Die CTD soll mehrmals geprüft und nicht zu oft hergestellt werden. Bei Kreuzneutralisationstesten ist zu beachten, daß die bis zur CTD verdünnten Phagenpräparationen durch Zusatz der gleichen Menge Antiphagenserum um die Hälfte verdünnt werden. Zur Herstellung der CTD sollen für jede Verdünnungsstufe andere Pipetten benutzt werden. Auswaschen von Pipetten mit Bouillon zeigte, daß zahlreiche Phagen in der Pipettenlichtung hängenblieben. Wurden Phagen mit einer einzigen Pipette titriert, so erreichten wir für eine konfluierende Lyse Titer bis zu 10^{-12}, während wir mit jeweils verschiedenen Pipetten bei den gleichen Phagen Titer von 10^{-4} bis 10^{-5} erhielten.

Weiter sollen die Bakteriophagen öfter frisch angereichert werden, da bei längerem Gebrauch einer Phagenpräparation Verunreinigungen auftreten können und ein Titeranstieg durch Verdunstung der Suspensionsflüssigkeit möglich ist. Zweimal entwickelte sich in unseren Lysaten ein Pilz, der aber die lytische Wirkung der betreffenden Präparationen nicht beeinträchtigte und auf Agarplatten erst nach einigen Tagen, also nach Ablesung der Phagenreaktionen, anging. Ähnliches berichtet Nicolle (40).

Fehlerquellen, die den einzelnen Untersuchungsverfahren eigentümlich sind, werden unten besprochen.

II. Ergebnisse der Untersuchungen über Vi-Phagen

1. Phagennachweis

Der Nachweis von Vi-Phagen aus Abwasser war nicht überraschend, da dort, als Folge der Beimengung von Fäkalien, stets mit der Anwesenheit von Vi-Phagen zu rechnen ist. Dazu sind Bakteriophagen gegen Witterungseinflüsse recht beständig. Diénert (15) beobachtete, daß Phagen sich in Wasser und Boden bis zu mehreren Monaten halten. Guélin (25, 26, 27) übertrug bekannte Vi-Phagen in Freiluftbecken. Sie stellte dabei fest, daß "der Typhusphage in stagnierenden Gewässern wochenlang nachgewiesen werden kann" (27). In letzter Zeit infizierten Rische u. Mitarb. (46) einen Wasserlauf mit Typhus-Vi-Phagen. Sie konnten diese Phagen über 33 km und während dreier Tage beobachten und stellten fest, daß die Abnahme der Phagenzahl lediglich auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen war. In einem Vorversuch übertrugen Rische u. Mitarb. die gleichen Phagen in Wasserproben und wiesen sie noch nach 10 Tagen darin nach.

Der Nachweis von Vi-Phagen wurde auch dadurch erleichtert, daß die Phagen zur Schaffung optimaler Isolierungsbedingungen auf einem Typhus-Vi-Stamm angereichert wurden.

Beim Vi-Phagennachweis hatten wir uns folgende Fragen vorzulegen: reichert der Typenstamm A von S. typhi alle in einer Probe enthaltenen Vi-Phagen an und werden mit dem geschilderten Abimpfungsverfahren alle angereicherten Phagen erfaßt?

Dazu ist zu sagen, daß die Züchtung eines Phagengemisches auf einem bestimmten Bakterienstamm ein Selektionsverfahren darstellt. So fand sich bei der Untersuchung von angereicherten und längere Zeit ohne Trennungsgang fortgezüchteten Abwasserfiltraten ein allmählicher Schwund von Valenzen, besonders gegen Ruhrbakterien. Allerdings läßt sich diese Beobachtung auch durch die Anpassung der Phagen an den Wirtsstamm erklären.

Weiter ist es unwahrscheinlich, daß alle angereicherten und verschiedenartigen Phagen zur Isolierung gelangen. Lediglich Phagen, die sich bis zu einem hohen Titer anreichern lassen, kommen überhaupt in den Trennungsgang, und aus technischen Gründen konnten nur wenige Phagenlöcher zur weiteren Untersuchung ausgewählt werden. Die Tatsache, daß die Vi-Phagen 5 und 6 nur in einer einzigen Probe gefunden wurden, zeigt, daß unser Verfahren großen Zufälligkeiten unterworfen ist.

2. Phagenbestimmung

Da im Schrifttum nicht genügend Angaben über Eigenschaften von Vi-Phagen zu finden sind, können die vorstehend erwähnten Ergebnisse nur teilweise mit denen anderer Untersucher verglichen werden; dies sei im folgenden versucht:

a) Lysespektren

Abgesehen von den verschiedenen Präparationen des Phagen II liegen in der Literatur nur wenige Angaben über das lytische Verhalten der klassischen Vi-Phagen vor, von Scholtens (49) über die Phagen I und IV, von Brandis u. Imamura über den Phagen VII. Diese Mitteilungen sind teilweise nicht ausführlich, so daß ein Vergleich mit den entsprechenden Angaben in Tabelle 2c schwer ist. Dazu kommen Verschiedenheiten der Methodik, die Abweichungen von den vorliegenden Ergebnissen gut erklären. So verwendeten die genannten Autoren zur Darstellung der Lysereaktionen nicht die Blauplatte, die, wie erläutert, auch sehr schwache Reaktionen erfaßt. Außerdem verwendete Scholtens im Gegensatz zu Brandis u. Imamura und zu uns verdünnte Phagenpräparationen.

Trotz der abweichenden Methodik gelang es uns, die Angaben von Scholtens über das Verhalten der Phagen I und IV zu bestätigen, soweit die Reaktionen positiv waren. Auch Phage VII verhielt sich im wesentlichen wie erwartet. Allerdings geben Brandis u. Imamura an, daß Phage VII den Typenstamm F_1 nicht lysiert, während wir, ebenfalls mit einer unverdünnten Präparation und bei mehrfacher Wiederholung der Versuche, immer wieder eine konfluierende Lyse fanden. Diese Abweichung ist vielleicht dadurch zu erklären, daß es sich bei dem Typenstamm F_1 um einen älteren Laborstamm handelt, der sich möglicherweise in seiner Affinität zu dem Phagen VII ändert.

Die Lysespektren der Tabellen 2a und b gelten selbstverständlich nur für die Typhus-Vi-Standardtypenstämme, wie wir sie von London erhalten.

b) Lochgröße

In der nachstehenden Tabelle sind die im Schrifttum vorhandenen Angaben unseren Ergebnissen gegenübergestellt.

Tab. 9

Untersucher	Vi-Phagen					
	I	II	III	IV	V	VII
Brandis u. Imamura, 4						L
Craigie u. Yen, 10, 11	S	M	L	M		
Desranleau, 13					L	
Ferguson u. Mitarb., 19	S		L	S		
Giuntini u. Mitarb., 21	S	L		L		
Ackermann	S	M	L	S	L	M

Legende :

S = "small"; kleine Phagenlöcher, Durchmesser bis 0,5mm
M= "medium"; mittelgroße " " 0,5-1,5mm
L = "large"; große " " über 2mm
leere Felder = keine Angaben

Die eigenen Ergebnisse weichen besonders von den Angaben von Giuntini u. Mitarb. ab. Diese Untersucher bestimmten die Lochgröße der Phagen I, II und IV mit der Methode der "double couche de gélose" (Gratia 1936, zitiert nach 22). Sie brachten dabei ein flüssiges Gemisch von Agar und Phagen- und Bakteriensuspension auf eine Agarplatte. Dazu stellte Klinge (33) fest, daß Phagenlöcher in diesem Schichtgußverfahren größer ausgebildet werden. Wir verzichteten auf diese Methode, da wir die Lochgröße während der Untersuchungen über die Temperaturempfindlichkeit der Vi-Phagen kontrollieren wollten.

Andererseits stimmen unsere Befunde mit denen von Desranleau und Ferguson u. Mitarb. überein. Im übrigen zeigt Tabelle 9, daß in zahlreichen Untersuchungen abweichende Ergebnisse gefunden wurden, d. h. daß die Lochgröße als Kriterium nicht überschätzt werden darf.

c) Temperaturempfindlichkeit

Noch problematischer als die Feststellung der Lochgrößen scheint nach den vorliegenden Ergebnissen die Ermittlung der Temperaturempfindlichkeit zu sein.

Die von uns als TDP der Phagen I und IV (66° C) angegebene Temperatur entspricht ungefähr dem TDP des Phagen I nach Brandis u. Imamura und nach Craigie u. Yen (12) (68° C für 60 bzw. 67-70° C für 30 Minuten). Dagegen wird Phage IV nach den gleichen Untersuchungen in 60 Minuten schon bei 62° C bzw. in 30 Minuten bei 59-62° C

abgetötet. Diese Abweichungen erklären sich einmal daraus, daß die kritische Testverdünnung bei Kleinlochphagen nicht leicht einzustellen ist; hierbei sind zur Herbeiführung einer konfluierenden Lyse relativ viel Phagen nötig, so daß sehr gut einzelne Phagen "maskiert" werden können. Weiter werden sich, wie Abb. 1 zeigt, in einer Phagenpopulation immer einige Phagen finden, die später als die anderen durch Hitze inaktiviert werden.

Für den Phagen II erhielten wir einen TDP von 68° C, was den Angaben von Craigie u. Yen entspricht (69-72° C für 30 Minuten). Bezüglich des Phagen V teilt Desranleau zwar den TDP (58-60° C), aber nicht die Versuchszeit mit, so daß ein Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich ist.

Unsere Kurven über die Thermoresistenz der Phagen I und IV verlaufen wesentlich anders als die von Giuntini u. Mitarb.. Nach diesen Autoren verhält sich Phage I ungefähr wie unsere Phagengruppe D und Phage IV wie Gruppe C, was einem TDP von 62 bzw. 60° C entspricht (s. Tab. 4). Darüber hinaus stellten Giuntini u. Mitarb. eine Kurve über das Verhalten des Phagen II auf, die sich ungefähr mit Kurve B deckt. Die in Gruppe B der Tabelle 5 zusammengefaßten Phagen besitzen einen TDP von ungefähr 59° C, und wir fanden den Phagen II mit einem TDP von 68° C ausgesprochen thermoresistent. Die starken Abweichungen der Ergebnisse beweisen, wie schwierig und problematisch solche Versuche sind.

Vergleichen wir nun die Tabellen 4 und 5 bzw. Tabelle 4 mit Abbildung 1, so zeigt sich, daß nicht alle Phagen mit gleicher Absterbetemperatur (TDP) einen gleichartigen Verlauf der Absterbekurven besitzen.

Diese Differenzen erklären sich einmal daraus, daß die Phagenpartikel der einzelnen Präparationen unterschiedlich schnell inaktiviert werden, zum anderen, daß die kritischen Testverdünnungen für die Versuchsreihen, deren Ergebnisse in den Tabellen 4 und 5 niedergelegt sind, jeweils getrennt hergestellt wurden. Es muß damit gerechnet werden, daß die in verschiedenen Zeiten von ein und demselben Phagen angelegten Verdünnungen bezüglich der Zahl der Phagenpartikel im Rahmen der Fehlerbreite voneinander abweichen. Zu bedenken ist ferner, daß Temperaturschwankungen im Wasserbad selbst zu leicht erklärlichen Differenzen führen können. Obwohl ein relativ empfindliches Wasserbad benutzt wurde, traten als Folge der gegebenen Versuchsbedingungen Temperaturschwankungen auf, die etwa um $\pm$ 1° C lagen. Der Einfluß des Phagentiters auf den Verlauf der Absterbekurven dürfte weitgehend durch die Verwendung der CTD ausgeschaltet sein, da man annehmen kann, daß bei gleicher Lochgröße sonst unterschiedlicher Phagen in der CTD gleichviel Phagenpartikel enthalten sind.

d) Serologische Untersuchungen

Die Ergebnisse unserer Kreuzneutralisationsteste stimmen mit den Angaben von Brandis u. Imamura überein. Diese Untersucher konnten als erste nachweisen, daß die Vi-Phagen V und VI serologisch

nicht völlig selbständig sind, und daß bei Kreuzreaktionen zwischen diesen Phagen (und dem Phagen VII) Neutralisation erreicht wird. Dagegen sind die übrigen klassischen Vi-Phagen serologisch weitgehend selbständig. Diese Feststellungen wurden auch bei den vorliegenden Untersuchungen getroffen.

Unsere Vi-Phagen bilden eine serologische Gruppe mit Antigenbeziehungen besonders zum Phagen III (Tab. 6). Dabei zeigen Phage und Antiphagenserum 1a die wenigsten übergreifenden Reaktionen.

3. Identität der Vi-Phagen

Beim Vergleich aller bisher festgestellten Eigenschaften der Phagen 1a-3 und 4-6 zeigt sich, daß diese Phagen untereinander nahe verwandt sind. Man kann daher trotz ihres für sich charakteristischen Verhaltens annehmen, daß sie Mutanten weniger Grundformen darstellen.

Weiter fanden wir bei Gegenüberstellung der im Schrifttum vorliegenden Angaben, daß nach den Lysespektren die Phagen 1a-6 nicht mit den Phagen 2A, 3A und 4A von Brandis u. Imamura identisch sind, auch nicht mit den Phagen 2, 13, 20-29∝ und 8 Sch. von Scholtens (49). Obwohl mangels weiterer Angaben die beiden letztgenannten Phagengruppen nicht in jedem Falle zu unterscheiden sind, so genügten aber die wenigen differierenden Merkmale, die gefunden wurden, für die Feststellung einer Vielzahl verschiedener Vi-Phagen in einem geographisch relativ kleinen Gebiet. Dazu kommt, daß die Phagen 1a-6, 2A-4A sowie die meisten der Phagen von Scholtens nicht mit den klassischen Vi-Phagen I-VII identisch sind. Für die übrigen Phagen von Scholtens läßt sich dieses vermuten; die vorhandenen Angaben gestatten nicht in jedem Falle, die Phagen von Scholtens von den klassischen Vi-Phagen mit Sicherheit zu unterscheiden, machen aber höchst wahrscheinlich, daß keiner derselben mit einem der klassischen Vi-Phagen identisch ist. Es sei auch daran erinnert, daß Sertic u. Boulgakov schon im Jahre 1935, also vor der Entdeckung der Vi-Phagen, 75 "Typhusphagen" verschiedener Herkunft fanden und in 14 Serotypen unterteilen konnten (51).

Danach sind die Typhus-Vi-Phagen sehr artenreich. Gezielte Untersuchungen lassen mit großer Wahrscheinlichkeit die Entdeckung neuer Vi-Phagen erwarten.

4. Wert und Technik des Vi-Phagennachweises

Die epidemiologische Bedeutung des Vi-Phagennachweises als Indikator für eine mehr oder weniger rezente Kontamination des Untersuchungsmaterials durch S. typhi wird von zahlreichen Untersuchern hervorgehoben. Cocioba (7) stellt fest, daß die Anwesenheit von spezifischen Typhusphagen das Vorhandensein einer Typhusepidemie oder wenigstens von Keimträgern anzeigen kann. Nach Guélin (23, 24, 25) läßt die Anwesenheit von Vi-Phagen an eine mehr oder weniger zurückliegende Verunreinigung durch S. typhi denken bzw. diese ist durch den Nachweis von Großloch-Vi-Phagen bewiesen. Auch nach Leclerc

ist die Anwesenheit von Vi-Phagen in einem Gewässer "unter gewissen Bedingungen beweisend für eine Verunreinigung durch Typhuskeime". Zu ähnlichen Schlüssen kommen Parvis u. Tarantini (43) sowie Sturza u. Russu-Pandelescu (56). Zu bemerken ist, daß die Methodik der letzten vier Autoren den Nachweis von Vi-Phagen nur erlaubt, wenn in einer Probe ausschließlich Vi-Phagen vorkommen. In beiden Fällen wurden zwar Phagen auf Vi-Stämmen angereichert, aber nicht auf ihre Vi-Spezifität geprüft. Da O-Phagen sich auch auf Vi-Stämmen anreichern lassen, ist der Nachweis der Vi-Spezifität unerläßlich (Lenk u. Ackermann, 38).

Dagegen fand Hudemann (30) bei der Untersuchung von Lebensmitteln ungemein häufig Typhus-Vi-Phagen und verneinte die Bedeutung des Vi-Phagennachweises als Indikator für eine Verunreinigung durch S. typhi, da im Untersuchungsmaterial gleichzeitig Salmonellen nicht nachgewiesen wurden und auch eine Häufung von Typhusinfektionen nicht beobachtet werden konnte.

Nicolle u. Mitarb. (39, 41) wiesen nach, daß Vi-Phagen auch andere Keime als S. typhi lysierten, sofern diese Vi-Antigen bildeten. Die Vi-negativen Varianten der gleichen Keime wurden nicht gelöst. Unsere Befunde stimmen damit überein (s. Tab. 8).

Wenn Typhus-Vi-Phagen sich in Gegenwart von Vi-haltigen Nicht-Typhusstämmen vermehren, muß ein häufiges Vorkommen solcher Stämme die Bedeutung des Vi-Phagennachweises stark einschränken, wenigstens in bezug auf eine Verunreinigung durch S. typhi. Daher wurde durch eine Umfrage bei den für Salmonella-Diagnostik zuständigen Stellen in West- und Ostberlin die Frage der Häufigkeit von Vihaltigen Nicht-Typhusstämmen zu klären versucht. Es ergab sich, daß im Laufe der letzten drei Jahre (1957-60) nur einmal ein Ballerup-Stamm und wenige Male Dyspepsie-Coli-Stämme mit Vi-Antigen isoliert wurden. Dagegen teilte uns Doz. Dr. Sedlák (Prag) mit, daß 15% der in seinem Besitz befindlichen Citrobacter-Stämme Vi-Antigen enthielten, und in letzter Zeit wurden in unserem Institut 25 Vi-positive Citrobacter-Stämme gefunden (mündliche Mitteilung von Herrn Dr. Lenk), allerdings bei gezielten Untersuchungen.

Es ist wahrscheinlich, daß die Suche nach Vi-positiven Nicht-Typhusstämmen allgemein nicht intensiv erfolgt, da, von Vi-haltigen Paratyphus C- und Dyspepsie-Coli-Stämmen abgesehen, die pathogenetische Bedeutung dieser Keime nicht sicher bekannt ist. Eine aufmerksame Beobachtung gerade solcher Stämme könnte die aufgeworfene Frage möglicherweise klären.

Eine andere Frage ist, ob in einer Region neben Nicht-Typhusstämmen mit Vi-Antigen Vi-Phagen vorkommen, die diese Stämme auch lysieren. Tabelle 8 zeigt, daß Vi-Phagen sich auf den getesteten Stämmen durchaus nicht immer vermehren. So erhielt Billaudelle (2) mit allerdings nur einem Vi-Phagen auf 6 Vi-haltigen Nicht-Typhusstämmen keine Lyse, und Nicolle u. Mitarb. (41) fanden, daß der Vi-haltige Paratyphus C-Stamm 202 nur von dem Vi-Phagen I, nicht von den übrigen geprüften Vi-Phagen angegriffen wird. Auch Scholtens (47) berichtet über einen Vi-Phagen, der einen Ballerup-Stamm mit

Vi-Antigen nicht lysiert. Die Frage nach der hygienisch-epidemiologischen Bedeutung des Vi-Phagennachweises in bezug auf S. typhi muß also noch offen bleiben.

Ebenso offen ist die Frage nach einer Vereinfachung des Vi-Phagennachweises. Es ist unwahrscheinlich, daß ein bestimmter Nährboden die Lyse durch polyvalente Salmonellenphagen verhindern kann oder daß ein Typhusstamm gefunden wird, der ausschließlich Vi-Phagen anreichert. Durch Bebrütung von fraglichen Lysaten bei anderen Temperaturen als 37° C können Vi-Phagen erst nach Reinzüchtung als solche erkannt werden.

Der aussichtsreichste Weg zur Vereinfachung des Vi-Phagennachweises ist die Beobachtung der Lochgröße. Jedoch muß hierfür eine bestimmte Reihe von Voraussetzungen gegeben sein. Die wichtigste ist, daß die meisten Vi-Phagen sich auf einem geeigneten Teststamm als Großlochphagen verhalten, während polyvalente Phagen kleine Löcher bilden. Eine zweite Voraussetzung ist, daß in einer Region Großloch-Vi-Phagen vorkommen.

Von unseren 43 Vi-spezifischen Präparationen enthielten 33 Großlochphagen, und Guélin (23, 24) bezeichnet den Nachweis von Großlochphagen auf einem Typhus-Vi-Stamm als beweisend für eine Verunreinigung durch S.typhi. Sie isolierte mit einem Typhus-Vi-Stamm 20 Phagen, wovon 14 große Phagenlöcher bildeten und Vi-spezifisch waren. Die übrigen waren Kleinlochphagen und griffen teilweise Ruhr- und Colistämme an (24). Auch Leclerc (35) wies die Vi-Spezifität von Phagen nach, die auf einem Vi-Stamm als Großlochphagen erscheinen. Weiter wird darauf verwiesen, daß die Phagen P_4 und P_5 sowie die O-Phagen 1-3 auf dem Typenstamm A von S. typhi kleine Phagenlöcher bilden, und Guelin erwähnt an anderer Stelle (23) Typhus-Vi-Stämme lysierende, auf S. paratyphi B isolierte Kleinlochphagen.

Über die regionale Verteilung von Großloch- bzw. Kleinloch-Vi-Phagen liegen bis jetzt kaum Angaben vor; es ist auch ungeklärt, welche Phagenlöcher die bisher isolierten Kleinloch-Vi-Phagen auf allen Typhus-Vi-Typenstämmen bilden.

Zum Nachweis von Vi-Phagen kann so verfahren werden, daß das verdächtige Lysat nach Anreicherung auf einem Vi-Stamm so weit verdünnt wird, daß auf der Platte einzelne Phagenlöcher erscheinen. Die Anwesenheit von Vi-Phagen ist wahrscheinlich, wenn Phagenlöcher von 2-3 mm (Großlochphagen) Durchmesser entstehen. Die Anreicherung schafft optimale Bedingungen, so daß auch geringe Phagenbeimengungen erfaßt werden. Da jedoch angenommen werden kann, daß Vi-Phagen sich auf einem geeigneten Vi-Stamm bis zu einem höheren Titer anreichern lassen als polyvalente Salmonellenphagen und somit nach der Verdünnung der Lysate vorwiegend Vi-Phagen zur Beobachtung gelangen, stellt die Anreicherung einen zusätzlichen Vorteil dar. Der Nachweis von Vi-Phagen kann so nach 2 statt nach 12 Tagen erbracht werden.

Da Vi-haltige Bakterienstämme nicht nur Vi-Phagen anreichern, kann die Tatsache, daß die Bildung von Vi-Antigen an einen begrenzten

Temperaturbereich gebunden ist, nur nach Reinigung der Phagen ausgenutzt werden. Es kann so die Prüfung der Vi-Spezifität auf einer größeren Zahl von Teststämmen vermieden werden. Dazu wird das fragliche Lysat bei 37 und z. B. 43° bebrütet und auf einen festen Nährboden ausgeimpft. Vi-Phagen sind vorhanden, wenn die erste Platte eine Lyse zeigt, die zweite nicht. Einschränkend muß gesagt werden, daß Bloch (3), Doerr u. Grüninger (zitiert nach Bloch) und Kigasawa (32) Coliphagen erwähnen, die sich bei 43° C nicht mehr vermehren. Weiter geben Nicolle u. Mitarb. (39) an, daß bei 41, 5° C die Lyse durch verschiedene Paratyphus B-Phagen sistiert. Es ist jedoch nicht angegeben, ob die von den genannten Autoren geprüften Phagen auch Typhusbakterien lysieren.

III. Bewertung der Untersuchungsmethoden

Unser Verfahren der Phagenisolierung ist, wie oben gesagt, zahlreichen Zufälligkeiten unterworfen und erlaubt nicht, alle im Untersuchungsmaterial enthaltenen Vi-Phagen sicher zu erfassen. Dagegen kann die Vi-Spezifität von Phagen einwandfrei festgestellt werden.

Zur Differenzierung einer größeren Zahl Phagen halten wir die Aufstellung von Lysespektren für die beste Methode, wobei die Phagen zweckmäßig in verdünntem Zustand ausgeimpft werden. Allerdings ist anzunehmen, daß auch so nicht alle Varianten einer Phagenrasse erfaßt werden.

Die Lochgröße eines Phagen ist leicht festzustellen und kann in Versuchen wie der Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit kontrolliert werden, was bei der Abhängigkeit der Lochgröße von zahlreichen, oben angedeuteten Faktoren einen wesentlichen Vorteil darstellt. Sie ist ein wertvolles Kriterium. Da sie die Unterscheidung einer größeren Zahl Phagen nicht erlaubt, kann sie nur zur Charakterisierung von Phagen dienen.

Ähnlich wertvoll ist die Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit, wobei die Beobachtung der Phageninaktivierung als Funktion der Zeit einen großen Aufwand erfordert. Wir hatten hierbei einen Verbrauch von über 1000 Platten, die teilweise schwer auszuzählen waren.

Kreuzneutralisationsteste mit Antiphagenseren können nur durchgeführt werden, wenn die Zahl der zu untersuchenden Phagen nicht zu groß ist. Diesem Verfahren, das sicher die Differenzierung einer großen Phagenzahl erlaubt, steht der kostspielige Tierversuch entgegen.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, daß zur Charakterisierung eines Phagen ein Kriterium nicht ausreicht. Dieses erweist sich am deutlichsten bei den Phagen III und V, die in Lysespektrum, Lochgröße und Temperaturempfindlichkeit fast gleich, aber serologisch verschieden sind. Weiterhin besitzt Phage 1b ein ähnliches Lysespektrum wie Phage 1c, aber eine andere Lochgröße und Temperaturempfindlichkeit.

IV. Folgerungen

Die wichtigsten Folgerungen aus der vorliegenden Arbeit sind:

1. In der Natur scheinen zahlreiche verschiedene Vi-Phagen vorzukommen.

2. Von einer gezielten Untersuchung ist die Entdeckung neuer Vi-Phagen zu erwarten.

3. Aus den Lysespektren der klassischen Vi-Phagen und der Phagen 1a-6 läßt sich schließen, daß die Zahl der Reaktionsweisen begrenzt ist. Eine Untersuchung aller Vi-Phagen in diesem Sinne ist wünschenswert, auch im Interesse einer Klassifizierung der Vi-Phagen selbst.

4. Ein Phage kann nur durch mehrere Kriterien charakterisiert werden. Hiervon ist die Aufstellung eines Lysespektrums am bedeutsamsten.

5. Der Nachweis von Vi-Phagen ist bis auf weiteres nicht beweisend für eine mehr oder weniger gleichzeitige Verunreinigung durch S. typhi, da die Häufigkeit des Vorkommens von Vi-haltigen Nicht-Typhusstämmen noch ungeklärt ist.

6. Vi-Phagen erscheinen auf einem geeigneten Teststamm meist als Großlochphagen, polyvalente hingegen als Kleinlochphagen. Die Verwendung eines geeigneten Teststammes kann des Nachweis von Vi-Phagen wesentlich erleichtern.

E. Zusammenfassung

Aus Abwasser wurden 2 polyvalente und die 14 Vi-Phagen 1a-6 isoliert. Diese Vi-Phagen wurden zusammen mit den klassischen Vi-Phagen I-VII auf ihr lytisches Verhalten auf S. typhi, ihre Lochgröße und Temperaturempfindlichkeit geprüft. Sie erwiesen sich als weitgehend verwandt mit den Vi-Phagen III und V. Soweit untersucht, stehen sie serologisch dem klassischen Phagen III nahe.

Die Phagen 1a-6 lassen sich nach ihren Lysespektren in zwei Gruppen aufteilen, wobei die einzelnen Phagen untereinander nahe verwandt sind. Soweit vergleichbare Angaben vorliegen, sind sie mit anderen bekannten Vi-Phagen nicht identisch.

Versuche über die Typhus-Spezifität der Vi-Phagen und die Vereinfachung des Vi-Phagennachweises wurden durchgeführt. Vi-Phagen lysieren auch andere Vi-haltige Keime als S. typhi. Ein Verfahren zum einfacheren Nachweis von Vi-Phagen wird vorgeschlagen; es besteht in der Beobachtung der Lochgröße auf einem geeigneten Teststamm.

Die Bedeutung der Nährböden, Fehlerquellen sowie der Wert der angewandten Untersuchungsmethoden werden besprochen.

Literatur

1 Anderson, E. S., Felix, A.: The Vi type-determining phages carried by Salmonella typhi. J. Gen. Microbiol. 9, 65 (1953)

2 Billaudelle, H.: Über die Grenzen der serologischen Spezifität bei Salmonella. Zschr. Immunforschg. 108, 119 (1951)

3 Bloch, H.: Der Einfluß der Temperatur auf den Ablauf der Bakteriophagenreaktion. Arch. ges. Virusforschg. 2, 268 (1943)

4 Brandis, H., Imamura, P. S.: Vergleichende Untersuchungen über Vi-Bakteriophagen. Zschr. Hyg. 143, 50 (1956)

5 Brandis, H., Maurer, H.: Die Grundlagen der Typisierung von Typhus- und Paratyphusbakterien mit Bakteriophagen. Klin. Wschr. 33, 49 (1955)

6 Chomiczewski, J.: Ergänzungslysotypie der Typhus-Lysotypen F_1 und F_4 mit Hilfe eines neuen Vi-Phagen. 4. Coll. ü. Fragen der Lysotypie, Wernigerode 1960

7 Cocioba, J.: Présence du bactériophage dans les eaux. Son importance épidémiologique. Zbl. Bakt. I Ref. 143, 91 (1943)

8 Craigie, J.: Bacteriophages for the V form of Salmonella typhi. J. Bact. 31, 56 (1936)

9 Craigie, J., Brandon, K. F.: Bacteriophage specific for the O-resistant V form of B. typhosus. J. Path. Bact. 43, 233 (1936)

10 Craigie, J., Yen, Ch. H.: V bacteriophages for B. typhosus. Trans. Proc. Roy. Soc. Canada 31, Sect. V, 79 (1937)

11 Craigie, J., Yen, Ch. H.: Observations on V bacteriophage (abstract). Canad. J. Publ. Health 29, 38 (1938)

12 Craigie, J., Yen, Ch. H.: The demonstration of types of B. typhosus by means of preparations of type II Vi phage. I. Principles and technique. Canad. J. Publ. Health 29, 448 (1938)

13 Desranleau, J.-M.: Détermination des types du bactérium typhosum par les bactériophages. Union Méd. Canada 76, 834 (1947)

14 Desranleau, J.-M., Martin, I.: Bacteriophage typing in the province of Quebec. Canad. J. Publ. Health 41, 128 (1950)

15 Diénert, F.: De l'utilité de la recherche du bactériophage dans les eaux. Bull. Acad. Méd. Paris III, 112, 611 (1934)

16 Felix, A., Bhatnagar, S. S., Pitt, R. M.: Observations on the properties of the Vi antigen of B. typhosus. Brit. J. Exper. Path. 15, 346 (1934)

17 Felix, A., Pitt, R. M.: A new antigen of B. typhosus. Its relation to virulence and to active and passive immunisation. Lancet 1934, II, 186

18 Felix, A., Pitt, R. M.: Virulence of B. typhosus and resistance to O antibody. J. Path. Bact. 38, 409 (1934)

19 Ferguson, W. W., Juenker, A., Ferguson, R. A.: Characterization of latent 'phages from strains of Salmonella typhi typable and untypable with Vi 'phage. Am. J. Hyg. 62, 306 (1955)

20 Friedberger, E., Vallen, J.: Über die Wirkung eines Typhusbakteriophagen in Gegenwart von roten Blutkörperchen. Klin. Wschr. 36, II, 1649 (1923)

21 Giuntini, J., Edlinger, E., Nicolle, P.: Etude de quelques bactériophages typhiques Vi. Morphologie des corpuscules au microscope électronique, aspect des plages et thermosensibilité. Ann. Inst. Pasteur 84, 787 (1953)

22 Gratia, A.: Recherches sur la concentration et la purification des bactériophages. Arch. ges. Virusforschg. 2, 235 (1943)

23 Guélin, A.: Application de la recherche des bactériophages à l'étude des eaux polluées. I. La survie des entérobactériacées dans les eaux. II. Bactériophages des eaux à grandes et à petites plages. Ann. Inst. Pasteur 82, 78 (1952)

24 Guélin, A.: Bactériophages typhiques à grandes et à petites plages des eaux polluées et leur photosensibilité. Ann. Inst. Pasteur 88, 576 (1955)

25 Guélin, A.: Sur le choix des souches étalons pour la détection du bacille typhique dans les eaux par la recherche des bactériophages spécifiques. Ann. Inst. Pasteur 79, 186 (1950)

26 Guélin, A.: Etude des bactérophages typhiques Vi dans les eaux. Ann. Inst. Pasteur 75, 485 (1948)

27 Guélin, A.: La survie du bacille typhique Vi et de son bactériophage dans l'eau. Ann. Inst. Pasteur 78, 78 (1950)

28 Herčik, F.: Biophysik der Bakteriophagen. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1959

29 Herrlich, A., Mayr, A., Mahnel, H.: Das Antikörperbild der Variola-Vaccineinfektion. Zbl. Bakt. I Orig. 175, 163 (1959)

30 Hudemann, H.: Typhus-Vi-Phagen in der Natur, Fundorte und Bedeutung.
4. Coll. ü. Fragen der Lysotypie, Wernigerode 1960

31 Kauffmann, F.: Über einen neuen serologischen Formenwechsel der Typhusbacillen. Zschr. Hyg. 116, 617 (1934/35)

32 Kigasawa, T.: Bakteriophagenvermehrung bei höheren Temperaturen. Zschr. Hyg. 108, 508 (1928)

33 Klinge, K.: Pseudomonas fluorescens, ein Boden- und Wasserkeim. III. Identifizierung von P. fluorescens-Stämmen durch Bakteriophagen. Arch. Mikrobiol. 34, 270 (1959)

34 Lanni, F., Lanni, Y. Th.: Antigenic structure of bacteriophage. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 18, 159 (1953)

35 Leclerc, H.: Les bactériophages typhiques dans les eaux de Hanoi. Ann. Inst. Pasteur 92, 369 (1957)

36 Lenk, V.: Untersuchung über die Beeinflußbarkeit der Lysotypieergebnisse durch Änderung des pH-Wertes und durch Zusatz von Glukose zum Nähr-Agar. Zbl. Bakt. I Orig. 168, 502 (1957)

37 Lenk, V.: Über die Verwendung von Wasserblaudextroseplatten bei der Vi-Phagenlysotypie von Salm. typhi. Coll. ü. Fragen der Lysotyie, Wernigerode 1955

38 Lenk, V., Ackermann, H.-W.: Erfahrungen über die Isolierung von Typhus-Vi- und Salmonellaphagen aus Fluß- und Abwasser. Zbl. Bakt. I Orig. 181, 224 (1961)

39 Nicolle, P., Jude, A., Diverneau, G.: Antigènes entravant l'action de certains bactériophages. Ann. Inst. Pasteur 84, 27 (1953)

40 Nicolle, P., Pavlatou, M., Diverneau, G.: Les lysotypies auxiliaires de Salmonella typhi. I. Subdivision du type A et du groupe I + IV par une nouvelle série de phages. Ann. Inst. Pasteur 87, 493 (1954)

41 Nicolle, P., Rita, G., Huet, M.: Démonstration, par l'épreuve des bactériophages Vi, d'une analogie physiologique entre les antigènes Vi présents chez des espèces bactériennes différentes.
Ann. Inst. Pasteur 81, 473 (1951)

42 Nyberg, C.: Über Nachweis und Gewinnung von Bakteriophagen. Zbl. Bakt. I Orig. 122, 270 (1931)

43 Parvis, D., Tarantini, F.: Presenza e significato epidemiologico dei batteriofagi antitifici Vi ed anticoli in acque di varia natura. Boll. Ist. Sieroter. Milan. 37, 289 (1958)

44 Raettig, H.: Bakteriophagie I u. II, G. Fischer, Stuttgart 1958

45 Raettig, H., Hofmann, S.: Die Vorteile der Farbindikatorplatte in der experimentellen Arbeit mit Bakteriophagen. Zbl. Bakt. I Orig. 161, 121 (1954)

46 Rische, H., Keiger, G., Stempel, J.: Der Einfluß der Selbstreinigung eines Vorfluters auf Bakteriophagen. Gesundheits-Ing. 82, 210 (1961)

47 Scholtens, R. Th.: Absorption of Vi bacteriophages by typhoid bacilli and paratyphoid C strains. J. Hyg. 37, 315 (1937)

48 Scholtens, R. Th.: Lysotypie von S. typhi mit anderen anpaßbaren Phagen als Vi-Phage II. Zbl. Bakt. I Orig. 168, 499 (1957)

49 Scholtens, R. Th.: Phage typing of Salmonella typhi in the Netherlands. A. v. Leeuwenhoek 16, 245 (1950)

50 Scholtens, R. Th.: The resistance developed against bacteriophage. J. Hyg. 36, 452 (1936)

51 Sertic, V., Boulgakov, N. A.: Groupement des bactériophages d'après leur type antigénique. C. R. Soc. Biol. 119, 983 (1935)

52 Sertic, V., Boulgakov, N. A.: Sur la sensibilité des souches d'Eberthella typhi au bactériophage, en relation avec les caractères antigéniques. C. R. Soc. Biol. 122, 35 (1936)

53 Sertic, V., Boulgakov, N. A.: Technique de l'isolement de bactériophages en lignées pures. C. R. Soc. Biol. 119, 690 (1935)

54 Sonnenschein, C.: Bacterium typhi haemolyticum. Experimentelle Züchtung neuer Bakterientypen durch Bakteriophagen (Beitrag zur angewandten Bakteriophagie). Zbl. Bakt. I Orig. 111, 177 (1929)

55 Sonnenschein, C.: Wirkung von Bakteriophagen auf Typhusbakterien. Hämolysierende, schleimig wachsende, unbewegliche Formen von Typhusbakterien (Beitrag zur angewandten Bakteriophagie und experimentellen Bakterienveränderung). Münch. Med. Wschr. 76, 355 (1929)

56 Sturdza, S. A., Russu-Pandelescu, M.: Über die Bedeutung des Bakteriophagennachweises bei Gewässeruntersuchungen. Städtehyg. 9, 81 (1958)

57 Weidel, W., Koch, G.: Über die Rezeptorsubstanz für den Phagen T 5*. III. Serologische Untersuchungen. Zschr. Naturforschg. 10b, 694 (1955)

58 Winkle, St.: Mikrobiologische und serologische Diagnostik, G. Fischer, Stuttgart 1955

Herrn Professor Dr. med. Bernhard Schmidt bin ich für sein Interesse und seine Beratung sowie seine großzügige Unterstützung, besonders bei der Durchführung der Tierversuche, zu außerordentlichem Dank verpflichtet. Auch Herrn Dr. med. Volker Lenk darf ich für seine ständige Unterstützung und die Überwachung der Versuche vielmals danken.

Lebenslauf

Ich, Hans-Wolfgang Ackermann, wurde am 16. 6. 1936 als Sohn des Zahnarztes Dr. med. dent. Hans Werner Ackermann und seiner Ehefrau Luise-Charlotte, geb. Schuler, zu Berlin geboren.

In der Zeit von 1942 bis 1947 besuchte ich die Grundschulen in Berlin-Niederschöneweide, Brixlegg/Tirol sowie in Schopfheim und Gersbach/Baden. Vom Jahre 1947 bis zum Jahre 1955 besuchte ich das Französische Gymnasium zu Berlin und legte dort am 1. 3. 1955 die Reifeprüfung mit "gut" ab.

Am 5. 4. 1955 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, Fachrichtung Medizin, immatrikuliert. Nach 5 Semestern Studium bestand ich am 30. 10. 1957 die ärztliche Vorprüfung mit "gut", und nach weiteren 6 Semestern die ärztliche Prüfung, ebenfalls mit "gut". Vom 1. 5. bis zum 31. 8. 1961 war ich als Medizinalassistent in der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung des Städtischen Rudolf Virchow-Krankenhauses beschäftigt.

Seit Oktober 1958 bin ich Doktorand bei Herrn Professor Dr. med. Bernhard Schmidt im Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin.